

## *aly/aly* マウス胆管上皮内および胆管腔内にみられる 異常好酸性物質の病理学的, 免疫組織化学的解析

金沢大学医学部医学科病理学第二講座 (主任: 中沼安二教授)

常 山 幸 一

最近我が国で開発された *ALY/Nsc Jcl-aly/aly* マウスは全身の末梢リンパ節およびパイエル板を欠損し, IgA と IgG の産生がなく, IgM の産生が著しく低値を示す免疫不全マウスである. このマウスの免疫グロブリン産生異常は常染色体単純劣性遺伝子の支配によって発現することが確認され, この遺伝子は遺伝子記号 *aly* と命名された突然変異遺伝子であり, 免疫異常がホモ接合体 (*aly/aly*) のみに出現し, ヘテロ接合体 (*aly/+*) ではみられない. このマウスは特定病原体除去 (specific pathogen-free, SPF) 環境下において, 全身の諸臓器に非特異的なリンパ球浸潤を認めることが知られている. さらに, 唾液腺と脾臓ではリンパ球の浸潤が目立つことよりシェーグレン症候群の疾患モデルマウスとして注目されている. 最近, この *aly/aly* マウスの胆管系に特異的な異常像の出現することに気付いた. そこで, 今回 *aly/aly* マウスの胆管系の病理的解析を行った. まず, 出生直後, 8週令, 10週令, 12週令の各成熟段階における肝, 胆道系の変化を *aly/aly* マウスと *aly/+* マウスと比較検討した. 出生直後には *aly/aly* マウスと *aly/+* マウスの肝, 胆道系には明らかな異常所見は見られなかった. 8週令以降, *aly/+* マウスの肝, 胆管系には著変が見られないのに比べ, *aly/aly* マウスは, 門脈域内にリンパ濾胞形成を伴う軽〜中等度のリンパ球浸潤が見られ, 胆管上皮に種々の変性像, 偽幽門腺化生, 胆管破壊像, それに胆管を中心とする炎症所見が見られた. さらに, *aly/aly* マウスでは8週令以降の全例において, 総胆管から総肝管, 肝門部胆管などの大型胆管の上皮の胞体内に均一な好酸性物質の蓄積を認めた. ほとんどの胆管上皮細胞が好酸性物質を含むもの, 一部の上皮にのみ好酸性物質が含まれているものなど, この変化は胆管系で様々な程度で認められた. さらに, これらの好酸性物質を蓄積する胆管腔内には長方形〜多角形の好酸性の結晶物の出現が見られた. これら胆管系の異常所見はヘテロ接合体である *aly/+* マウスには全く見られず, *aly/aly* マウスに特徴的に出現する胆管系の変化と考えられた. 次に, 上皮細胞内の好酸性物質を電子顕微鏡的に検索した. 異常物質は均質な電子密度を有する無構造な物質で, 膜に囲まれた封入体であり胞体内に緊満性に貯留しており, 核や他の細胞内小器官を辺縁に圧排していた. この封入体の膜にリボソームと考えられる小球状体の付着が見られ, 一部で粗面小胞体や核膜腔と連続しており, 拡張した粗面小胞体と考えられた. 管腔内の長方形の結晶は均質な電子密度を呈する物質であった. これらの結晶構造は胆管の管腔内に主に見られたが, 細胞質内に局在するものや, 細胞膜を突き破るように胆管管腔内に突出しているものもみられ, 胆管上皮細胞から分泌され, 主に胆管腔内で結晶化する物質の可能性が高いと考えられた. 胆管上皮内の好酸性物質は過ヨウ素酸シッフ法染色やアルシアン青染色などの粘液染色やグリメリウス染色, フォンタナ・マッソン染色などの好銀性染色で陰性であったが, 免疫組織化学的検討でシスタチンC, ガストリン, セロトニン, ソマトスタチンなどの消化管ホルモンが陽性であった. これらの所見より *aly/aly* マウス胆管上皮に見られる好酸性物質は, 胆管上皮自身で産生されるが, 何らかの機序で胆管腔への排出が障害され, 胆管上皮の胞体内に貯留した消化管ホルモンあるいはその前駆体である可能性が高いと考えられた. そして, その発現は *aly/aly* マウスに見られる胆管炎と因果的に関連していると推察された. *aly/aly* マウスの胆管炎は程度に差があり, 高度な部位ではリンパ濾胞を伴った中等度以上のリンパ球浸潤が見られ, 原発性胆汁性肝硬変に特徴的とされる慢性非化膿性破壊性胆管炎に類似する像も見られた. 以上より, *aly/aly* マウスは胆管上皮細胞での物質の分泌, 産生機序の解析, さらに自然発生的胆管障害モデルとして有用と考えられた. 特に胆管腔内に貯留する物質に対する抗体を用いて, 胆管を選択的に破壊する実験的研究が期待され, ヒトの原発性胆汁性肝硬変の新しいモデルとなりうると思われた.

**Key words** *aly/aly* mouse, biliary epithelial cell, acidophilic substance, cystatin C, chronic cholangitis

最近, Miyawaki らにより我が国で新しい免疫不全マウスが開発され, その特異な免疫動態より, 粘膜免疫機構を含む種々の免疫機構やその異常の解析に有用なモデルマウスとして注目

されている<sup>1)~7)</sup>. このマウスは, 常染色体性単純劣性遺伝子支配下の突然変異体で, この突然変異遺伝子は遺伝子記号 *aly* と命名され, 突然変異体 (*aly/aly* ホモ接合体) は *aly/aly* マウス,

平成8年7月5日受付, 平成8年7月22日受理

Abbreviations: ABC/PO, avidin-biotin complex with horseradish peroxidase; AS, acidophilic substance; CNSDC, chronic nonsuppurative destructive cholangitis; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; di-PAS, diastase treated periodic acid Schiff; PAS, periodic acid Schiff; PBC, primary biliary cirrhosis; PBS, phosphate-buffered

突然変異系は *ALY* 系と呼ばれている。この *aly/aly* マウスでは液性免疫機能と細胞性免疫機能の両者に著しい障害の出現することが知られている<sup>10)</sup>。すなわち、*aly/aly* マウスの血清中の IgM はヘテロ接合体 (*aly/+* マウス) 群の約 1/3 のレベルしか検出されず、さらに IgG と IgA は血清中にはほとんど検出されない。また、遅延型アレルギー反応も弱く、同種皮膚移植片の著しい生着延長も認められる。しかし試験管内での検討では、*aly/aly* マウスの脾細胞は T 細胞マイトジェンおよび B 細胞マイトジェンに反応して増殖する機能を有している。さらにリンパ球混合反応もほぼ正常であり、細胞障害性 T 細胞が誘導される事も知られている。これまでの研究結果より、*aly/aly* マウスでの免疫異常はリンパ球とリンパ組織の微小環境との相互作用の異常に起因するのではないかと考えられている<sup>10)</sup>。しかし、未だ不明な点も多く残されている。

この *aly/aly* マウスでは肝、肺、腎、脾、唾液腺などで、主として血管周囲にリンパ球の集簇が認められる<sup>10)</sup>。この異常所見が *aly/aly* マウスに固有の自己免疫現象によるものなのか、あるいは感染性の変化を反映しているのかは明らかではない。さらに、脾では外分泌腺の破壊と脂肪組織による脾実質の置換もみられ、涙腺および唾液腺において腺房実質へのリンパ球浸潤と種々の組織破壊が観察されており *aly/aly* マウスはヒトのシェーグレン症候群の動物モデルになりうるのではないかと注目されている<sup>7)</sup>。特に、ヒトではシェーグレン症候群は原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis, PBC) と合併しやすく、唾液腺の導管の破壊像と PBC の肝内胆管の障害像にも類似点が多い<sup>8)~10)</sup>。さらに、シェーグレン症候群での唾液腺導管と PBC の胆管での共通抗原の発現も指摘されており<sup>11)12)</sup>、*aly/aly* マウスの胆管をめぐる病的変化の解析は、胆管と唾液腺の微小環境の共通性とも併せて、病理学的、免疫病理学的に興味深い研究テーマと考えられる。

最近、この *aly/aly* マウスの胆管系に慢性炎症反応を伴う興味ある病変の見られることに気付いた。この病変は 8 週令以降のマウスで明らかとなる。今回、出生直後、それに免疫学的な変化が明らかになるとされる 8 週令以降の *aly/aly* マウスを用い、肝、胆道系を中心に病理組織学的、免疫組織化学的な検討を行い、2, 3 の新しい所見を得たので報告する。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

#### 1. 成熟マウス

8 週令、10 週令、12 週令のホモ接合体 (*aly/aly* マウス (*ALY/Nsc Jcl-aly/aly*), 日本クレア, 東京) を使用した。それぞれ雌雄 3 匹以上を以下の検索に使用した。対照として、ヘテロ接合体 (*aly/+* マウス (*ALY/Nsc Jcl-aly/+*), 日本クレア) を同週令、同個体数ずつ用いた。いずれも特定病原体除去 (specific pathogen-free, SPF) 環境下で飼育され、購入時に感染の所見は見られなかった。

#### 2. 新生児マウス

新生児マウスでの変化を検討するために、妊娠 *aly/+* マウス (日本クレア) を 3 匹購入した。*aly/aly* マウスでは乳腺の発

育不全があり、哺育不能である。そのため、妊娠雌マウスにはヘテロ対照である *aly/+* マウスが使用されており、*aly/aly* 雄マウスと交配させ、*aly/aly* マウスを得ている。確率的には *aly/+* と *aly/aly* の新生児が同数得られるはずであるが、新生児期には *aly/aly* マウス固有の解剖学的特徴は未だ明らかにはされておらず、外見より *aly/aly* と *aly/+* を見分ける事は不可能である。そこで、3 個体の *aly/+* マウス雌より得られた全ての新生児 (計 29 匹) を対象として、それらの肝およびその他組織における炎症の程度や病変、特に胆管病変に差があるかどうかを組織学的に検討した。

### II. 胆管系およびその微小環境の形態学的検討

検索に供したマウスはそれぞれエーテル麻酔下で断頭にて屠殺し、直ちに脱血し開胸、開腹し、各々の臓器を摘出した。

#### 1. 組織学的観察

摘出臓器の一部を 10% 中性緩衝ホルマリンにて 2 日間固定後、型の如く、パラフィン包埋し、各ブロックより 20 枚以上の 3~5  $\mu$ m の薄切切片を作製した。これらの切片を型の如く、キシロール、エタノール系列で脱パラフィン後、HE 染色を行い、組織学的に観察した。残りの切片は、以下の特殊染色および免疫組織化学的検討に供した。

#### 2. 電子顕微鏡 (電顕) 的観察

摘出した肝臓の一部を冷 2% グルタルアルデヒド (0.1M, カコジル酸緩衝液, pH 7.4) 内で細切後、直ちに同液内で 90 分間固定した。0.1M, カコジル酸緩衝液で 3 回洗浄後、2% オスミウム酸でさらに 60 分間、後固定を行った。0.1M, カコジル酸緩衝液で 3 回洗浄した後、型の如くエタノール系列で脱水し、エポン包埋 (応研商事, 東京) し、1  $\mu$ m 切片を作製し、トリージン青染色を行い、観察に適したブロックを抽出した。トリミング後、超薄切片を作製し、続いて酢酸ウランとクエン酸鉛の 2 重染色を行い、透過電顕 H300 型 (日立製作所, 東京) で観察を行った。

#### 3. 特殊染色および免疫組織化学的検索

*aly/aly* マウス胆管上皮の異常、特に好酸性物質の同定を目的として、以下の特殊染色および免疫組織化学的検討を行った。

##### 1) 好銀性、銀還元性染色

内分泌細胞分泌顆粒の有無を検討するため、グリメリウス染色およびフォンタナ・マッソン染色を行った。なお、陽性対照として *aly/+* マウスの脾 (ランゲルハンス島) を用いた。

##### 2) 粘液染色

粘液性物質の有無を検討し、さらに解析するため、過ヨウ素酸シッフ法 (periodic acid Schiff, PAS) 染色、ジアスターゼ処理後 PAS (diastase treated-periodic acid Schiff, di-PAS) 染色、それにアルシアン青 (pH 2.5) 染色を行った。陽性対照として、*aly/+* マウスの腸管粘膜を用いた。

##### 3) 免疫組織化学的検討

表 1 に示した一次抗体を用い、マウス IgM, IgG, ガストリン, シスタチン C, ソマトスタチン, グルカゴン, セロトニンの検出を試みた。なお、これらの抗体の特異性を確認するための陽性対照として、IgM, IgG では *aly/+* マウスの腸管のリン

saline; PDC-E2, E2 component of pyruvate dehydrogenase complex; PSC, primary sclerosing cholangitis; SPF, specific pathogen-free; streptABC/AP, streptavidin-biotin complex with alkaline phosphatase; TBS, tris-buffered saline; 電顕, 電子顕微鏡

パ組織を、ガストリン、シスタチンCでは *aly*/+マウスの胃(幽門腺)を、ソマトスタチン、グルカゴン、セロトニンでは *aly*/+マウスの脾臓(ランゲルハンス島)を、それぞれの染色毎に使用した。IgM, IgG の各抗体はビオチン化抗体のため2次抗体を必要としないが、他のウサギポリクローナル抗体では、200倍に希釈したビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) 抗体 (Vector Laboratories, Burlingame, USA) を、またマウスモノクローナル抗体ではビオチン化ウマ抗マウス IgG (H+L) 抗体 (Vector Laboratories) を2次抗体として用いた。発色には以下に述べる、ペルオキシダーゼ結合アビジン-ビオチン複合体 (avidin-biotin complex with horseradish peroxidase, ABC/PO) (Vector Laboratories) とアルカリフォスファターゼ結合ストレプトアビジン-ビオチン複合体 (streptavidin-biotin complex with alkaline phosphatase, strept ABC/AP) (DAKO, Glostrup, Denmark) の2種類を用いた。

#### i. ABC/PO 染色法

Hsu ら<sup>13)</sup>に従い、以下の如く行った。型の如く脱パラフィンを行った切片を、0.3% 過酸化水素添加メチルアルコール液中で1時間反応させ、内因性ペルオキシダーゼを失活させた。次いで、非特異的結合反応を低下あるいは防止するため、切片を10% の非免疫動物(2次抗体の免疫動物と同種)血清で処理した。次に1次抗体を、リン酸緩衝液(phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.6) で予備実験によって決めた最適濃度(表1)に希釈し、4℃で1晩反応させた。その後、一次抗体を作成した各々の動物種に対するビオチン化2次抗体を200倍に希釈して室温で1時間反応させ、ABC/PO 溶液と30分間反応後、0.03% 過酸化水素添加ジアミノベンチジン (3,3'-diaminobenzidine, DAB) (Sigma, St. Louis, USA) で発色させた。なお、各々の反応の間には、切片をPBSにて3回以上十分に洗浄した。その後、ヘマトキシリンで核染色後、脱水封入し、鏡検した。

#### ii. streptABC/AP 染色

Wood ら<sup>14)</sup>に従い、以下の如く行った。型の如く脱パラフィン操作を行った後、非特異的結合反応を防止するため、切片を10% の動物血清(2次抗体の免疫動物と同種)で処理した。次に1次抗体を、予備実験によって決めた最適濃度(表1)に希釈し、4℃で1晩反応させ、それぞれに対応したビオチン化2次抗体(200倍希釈)を室温で1時間反応させ、strept ABC/AP 溶

液で30分間反応させた。その後、内因性アルカリフォスファターゼとの反応を阻害するため、1滴のレバミゾール (Vector Laboratories) を添加したファーストレッド (Fast Red, Vector Laboratories) 溶液で発色させた。なお、アルカリフォスファターゼの発色はリン酸塩によって抑制されるので、各反応の前後の洗浄および各抗体の希釈には0.15mM トリス緩衝液 (tris-buffered saline, TBS) (pH7.6) を用いた。また各抗体の希釈もTBSにて行った。

なお、これらの染色の反応特異性は1次抗体をPBSおよびTBSで置換し、反応が陰性化することで確認した。また、発色液中からDABあるいはファーストレッドを除き、反応の特異性の検討も行った。陽性、陰性の評価は、陽性対照として同時に染色された各臓器での染色強度を基準として行った。

なお、後述の如く免疫染色で陽性像を呈した抗シスタチンC抗体では、その抗原特異性をさらに確認する目的で、ヒト抽出シスタチンCによる吸収試験を行った。すなわち、抗シスタチンC抗体を型の如く希釈後、十分量のヒト抽出シスタチンC (Bio Pur AG, Bubendorf, Switzerland) を添加し、充分攪拌後室温にて1時間反応させた。反応後、1500Gにて3分間遠心し、上清を型の如く一次抗体として使用した場合、免疫組織化学的反応が陰性化あるいは著しく減少することを確認した。

#### 4) 共焦点レーザー顕微鏡による検討

strept ABC/AP 法で染色され、ファーストレッドで発色した標本を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM410, Carl Zeiss, Gottingen, Germany) 下で観察した。ファーストレッドはローダミンと同波長の蛍光物質を有するので、レーザー光は514nmのアルゴンレーザーを使用した。スキャン速度は8.65秒とし、ピンホールサイズ値は20とした。画像サイズは768×576ピクセルとした。画像アベレーシングは8回として画像を得た。

### Ⅲ. *aly/aly* マウス胆管上皮の初代培養とその観察

#### 1. 胆管上皮初代培養

*aly/aly* マウス胆管上皮にみられた好酸性物質の培養後の性状の変化を観察する目的で、当教室で確立したコラーゲンゲル培地上での胆管上皮培養法を用いて、*aly/aly* マウスの胆管上皮の初代培養を行った<sup>15)~18)</sup>。材料として30~35gの雄の *aly/aly* マウスを使用した。エーテル麻醉下で開腹し、静脈留置針 (24G, テルモ, 東京) を下大静脈に挿入して下大静脈を流入部、

Table 1. The list of primary antibodies used for immunohistochemistry

Antibodies against	Source	Animals immunized	Type of antibodies	Optimal dilution
m-Ig M (biotinylated)	Vector Lab Burlingame, USA	Goat	Monoclonal	1 : 200
m-Ig G (biotinylated)	Vector Lab	Horse	Monoclonal	1 : 200
h-gastrin	DAKO Glostrup, Denmark	Rabbit	Polyclonal	1 : 200
h-cystatin C	BioPur AG Bubendorf, Switzerland	Rabbit	Polyclonal	1 : 200
h-somatostatin	DAKO	Rabbit	Polyclonal	1 : 600
h-glucagon	DAKO	Rabbit	Polyclonal	1 : 600
h-serotonin	DAKO	Mouse	Monoclonal	1 : 80

m, mouse ; h, human ; Lab, Laboratories.

門脈を流出部とした流路を作製した。ペリスタポンプ (Masterflex, Chicago, USA) を用いて、カルシウムを含まない Hanks 液で灌流し、脱血した。次に 0.04% のコラゲナーゼ (コラゲナーゼ S-1, 新田ゼラチン, 大阪) と 0.005% トリプシンインヒビター (Sigma) を含む pH7.4 の Ham F-12 (Flow Laboratories, Irvine, UK) 培養液 (以下コラゲナーゼ溶液) を 10 分間灌流し、肝実質を消化した。肝臓を摘出後、クシと歯ブラシで肝細胞を剝離除去し、胆管樹 (biliary tree) を作製した。

次にカルシウムを含まないハンクス液中に胆管樹を浮遊させ実体顕微鏡下 (オリンパス, 東京) でマイクロサージャリー用のハサミとピンセット (夏目製作所, 東京) を用いて、肝門部胆管を細切し、微小組織片を作製した。なお、この時、胆管樹の一部をホルマリン固定パラフィン包埋標本用に別途採取し、目的とする好酸性物質が含まれていることを確認した。

微小組織片を 2.5mg/ml ホルスコリン (forskolin) (和光純薬, 大阪), 25ng/ml マウス上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF) (Upstate Biotechnology, New York, USA), 10mg/ml インスリン (insulin) (和光純薬), 100 単位/ml ペニシリン G (明治製菓, 東京), 100mg/ml ストレプトマイシン (明治製菓) および 10% スー・セラム (Nu-Serum) V (Becton-Dickinson Labware, Bedford, USA) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modification of Eagle's medium, DMEM) (Flow Laboratories)/HamF-12 (Flow Laboratories) 等量培地, 2.2%  $\text{NaHCO}_3$  および 200m MHEPES (和光純薬) を含む 0.05N NaOH 溶液をそれぞれ 8:1:1 の割合で混和し、それを細胞培養皿 (径 59mm, Corning, New York, USA) に 5ml 注入し、ゲル化 (固化) する前に 4℃ の冷蔵庫 (三洋, 大

阪) に一時的に保管した。次に 1 日間浮遊培養した微小組織片をピンセットを用いて、培養移植片としてコラーゲンゲル培地 (ゲル培地) 上に静置し、37℃ でゲル化した後、初代培養を行った。培養液は 3 日毎に交換し、経時的に 2 週間まで位相差顕微鏡 (オリンパス, 東京) で観察した。なお、予備実験として行った初代培養では、肝内胆道系の培養移植片は培養開始 3~5 日までは胆道系上皮細胞の増殖が間質系細胞より先行していても培養開始 1 週間~10 日目で間質系細胞が上皮細胞の増殖先端部に追いつき、追い越す現象が見られることが少なくないという知見を得ていた。このため、本実験では、初代培養開始 5 日~1 週間目に位相差顕微鏡下で、培養移植片と間質系細胞の増殖が見られるコロニー中心部の領域をハサミとピンセットを用いてゲル培地ごと除去し、胆道系上皮成分のみで、初代培養を続けた。

## 2. 組織学的観察

初代培養 1 週目と 2 週目の胆道系上皮細胞をゲル培地ごと 10% 緩衝ホルマリンで 48 時間固定した後、すだれ状にゲル培地をスライスし、パラフィン包埋後、薄切し、切片を作製した。切片は型の如く、キシロール、エタノール系列で脱パラフィン後、標準 HE 染色を施行し、光学顕微鏡にて観察した。

## 成 績

### 1. ALY マウス系の組織学的観察

#### 1. 8 週令, 10 週令, 12 週令

##### 1) 全身臓器

aly/aly マウスはいずれの臓器でも血管周囲性に種々の程度のリンパ球浸潤が見られ、肝、肺、腎ではリンパ球浸潤が有意

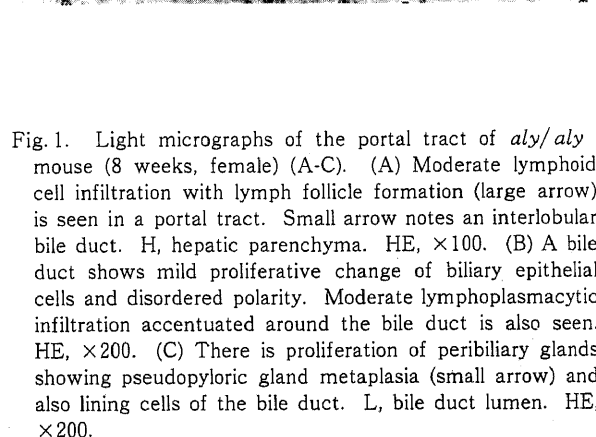
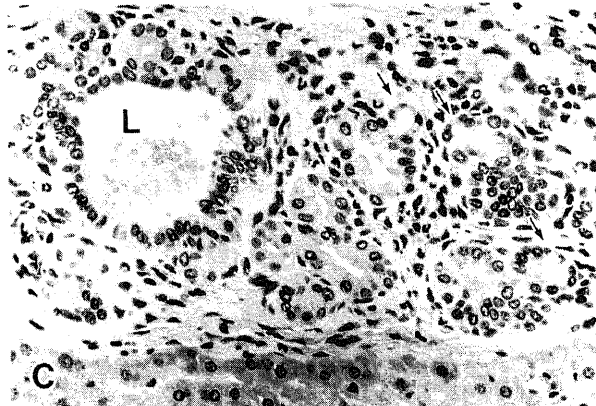
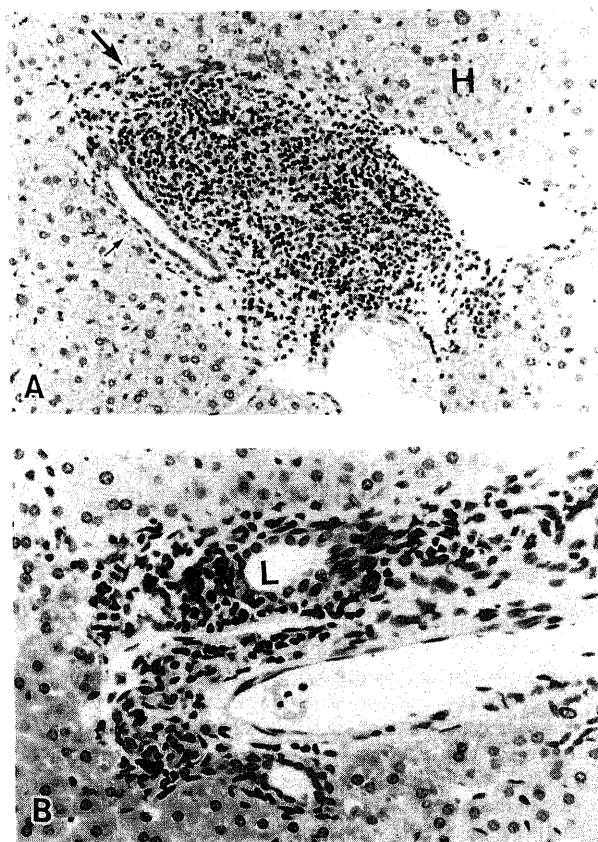


Fig.1. Light micrographs of the portal tract of *aly/aly* mouse (8 weeks, female) (A-C). (A) Moderate lymphoid cell infiltration with lymph follicle formation (large arrow) is seen in a portal tract. Small arrow notes an interlobular bile duct. H, hepatic parenchyma. HE,  $\times 100$ . (B) A bile duct shows mild proliferative change of biliary epithelial cells and disordered polarity. Moderate lymphoplasmacytic infiltration accentuated around the bile duct is also seen. HE,  $\times 200$ . (C) There is proliferation of peribiliary glands showing pseudopyloric gland metaplasia (small arrow) and also lining cells of the bile duct. L, bile duct lumen. HE,  $\times 200$ .

であった。さらに、検討した多くの組織では、軽度～中等度のリンパ球浸潤が主に間質に見られ、特に肺でリンパ球浸潤が目立ち、濾胞状のリンパ球集簇を呈していた。なお、胃腸管には明らかな炎症細胞浸潤巣は認められなかった。10週令以降では、唾液腺と脾の導管周囲にも軽度～中等度のリンパ球浸潤が見られた。なお、週令と炎症、特にリンパ球浸潤の程度に明らかな関連性は見られず、性差との関連も明らかではなかった。対照の *aly/+* マウスではいずれの個体でも、またいずれの臓器でも、明瞭な炎症所見は見られず、血管周囲性にごく軽度の非特異的なリンパ球浸潤がまれに散見される程度であった。

## 2) 肝・胆道系

*aly/aly* マウスではいずれの標本でも、軽度～中等度のリンパ球浸潤が見られた。リンパ球浸潤は血管周囲のみならず、門脈域全体に浸潤するものや胆管周囲に目立つものも存在した。同一標本あるいは個体において、門脈域のリンパ球浸潤の程度は様々であり、一方の門脈域でリンパ濾胞を伴う中等度のリンパ球浸潤が見られるのに対し、隣接する他の門脈域にはリンパ球浸潤がほとんど見られない標本もあり、肝での炎症の不均等分布が明らかであった。また、リンパ球浸潤が著明な門脈域では、同グ翰の胆管に種々の障害像がみられた。つまり、胆管上皮には増殖性的変化が見られ、外径は拡大し、さらに、慢性胆嚢炎でみられる偽幽門腺化生を高頻度に伴っていた。リンパ球浸潤と胆管上皮障害の目立つ胆管では、PBC で特徴的に見られる、慢性非化膿性破壊性胆管炎 (chronic nonsuppurative destructive cholangitis, CNSDC) に類似した病変も認められた (図1)。これらの胆管系の変化は肝内で非連続的に分布していた。なお、*aly/aly* マウスの週令と門脈域や胆管の炎症の程度には明らかな関連性はなく、性差との関係も明らかではなかった。

また検索した *aly/aly* マウス雌雄全例において、総胆管、肝門部大型胆管で、胆管上皮細胞の胞体内に好酸性の均質な物質の貯留がしばしば見られた。これら好酸性物質を貯留する胆管上皮細胞では核がやや偏在あるいは圧排されていた。好酸性物質の貯留は主に胆管上皮被覆細胞内に見られたが、胆管周囲で増生する付属腺上皮にも見られ、偽幽門腺化生を示す胆管上皮に隣接する上皮細胞にもこの好酸性物質の貯留が見られた。好酸性物質貯留の他に、胆管上皮細胞内や胆管腔内に、長方形～多角形あるいは不整形で好酸性の結晶が多数認められた (図2)。細胞質内から管腔内に細胞膜を突き破る様な好酸性結晶も見られ、好酸性結晶が上皮細胞から管腔内へ分泌途上と判断される所見もみられた。HE 染色による染色性は、上皮内の好酸性物質も、長方形の結晶もほぼ同様で、均質無構造なものであった。なお、週令や性差と、好酸性物質出現の頻度や程度との関連性は認められなかった。

対照であるヘテロ接合体である *aly/+* マウスでは非特異的なリンパ球浸潤が血管周囲、被膜直下、少数の門脈域にごくわずかにみられるのみであり、胆管上皮の変化や胆管炎は認められなかった。また、胆管上皮での好酸性物質の貯留や胆管腔内の好酸性結晶の出現は全く認められなかった (図3)。

## 2. 新生児期

次に *aly/aly* マウスに見られた好酸性物質や好酸性結晶が、出生前後の *aly/aly* マウス胆管上皮に存在するのか、あるいは後天的に出現するのかを、出生直後の29匹の *aly/aly* マウスの肝組織を用い検討した。

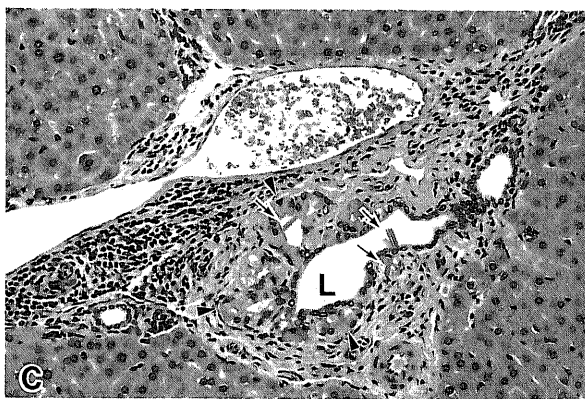
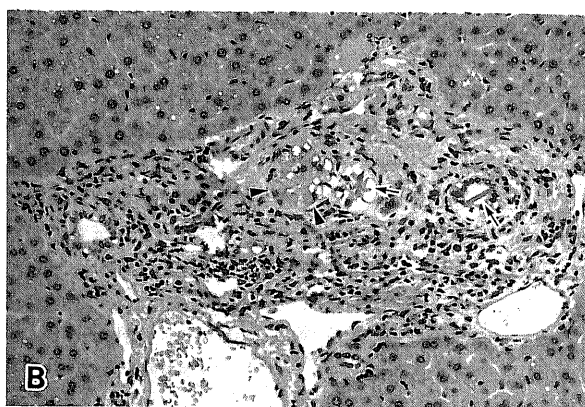
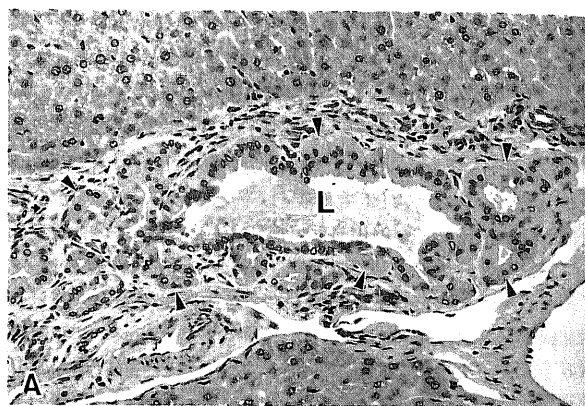


Fig. 2. Light micrographs of the portal tract of *aly/aly* mouse (8 weeks, female). (A) Acidophilic substance (arrow heads) are accumulated in the cytoplasm of almost all biliary epithelial cells of the large bile duct as well as of proliferative peribiliary glands. L, bile duct lumen. HE,  $\times 200$ . (B) Acidophilic substances (arrow heads) are seen in some epithelial cells of the medium-sized bile ducts. Several acidophilic crystals (arrows) are also identifiable in the lumen of these bile ducts. Epithelial cells showing pseudopyloric gland metaplasia and those containing acidophilic substance in their cytoplasm are intermingled. HE,  $\times 200$ . (C) Acidophilic substances (arrow heads) are seen in some of epithelial cells of the large bile ducts. Some of them also show pseudopyloric gland metaplasia. Several acidophilic crystals (arrows) are seen in the lumen (L) of the duct and in the cytoplasm of the biliary duct epithelial cell. HE,  $\times 200$ .



新生児期には、8週令以降の成熟 *aly/aly* マウスに見られた、肺、腎、脾、唾液腺へのリンパ球浸潤は見られず、肝臓においても門脈域や胆管周囲へのリンパ球浸潤は全く見られなかった。さらに、成熟 *aly/aly* マウス全例に見られた、総胆管、肝門部大型胆管の上皮細胞の胞体内の好酸性物質の貯留や好酸性結晶の出現は認められなかった (図4)。

## Ⅱ. 好酸性物質を貯留する胆管上皮細胞の電顕的観察

酸性物質を貯留する胆管上皮細胞では、胞体内に低電子密度の無構造物を充満しており、これらは1層の膜で囲まれて、封入体様の形態を示していた。この封入体の膜の外側にはリボゾームと考えられる小球状の構造物が付着しており、この封入体様の構造物が核膜腔や粗面小胞体とも一部で連続しており、この封入体は拡張した粗面小胞体と考えられた (図5)。さらに、この好酸性物質を貯留した封入体 (拡張した粗面小胞体) は、胆管上皮細胞胞体のほとんどを占め、そのためゴルジ装置

やその他の細胞内小器官は胞体の辺縁に圧排され、散見される程度であった。核も拡張粗面小胞体に圧排され偏在していた。これらの細胞内小器官自体には微細構造上の変化は明らかではなかった。

さらに、胆管腔および胞体の一部に、長方形～多角形を呈し、均一な電子密度の無構造の結晶が見られた (図6)。結晶はいずれもよくそろった構造をなし、管腔内に集簇するものと胞体内のものに形態学的な差異は見られなかった。長方形のものと多角形のものも基本的には同じ構造であり、いずれも本来は多角柱状をなす立体構造をとる結晶であると考えられた。結晶構造は膜による被覆や、分節はみられなかった。

## Ⅲ. 胆管上皮細胞内の好酸性物質の組織化学的、免疫組織化学的所見

これらの結果を表2、3に示す。胆管上皮に貯留する好酸性物質は、PAS 染色陰性、di-PAS 染色陰性、アルシアン青 (pH2.5) 染色で陰性であり、好銀性染色であるグリメリウス染色陰性、銀還元性染色であるフォンタナ・マッソン染色も陰性

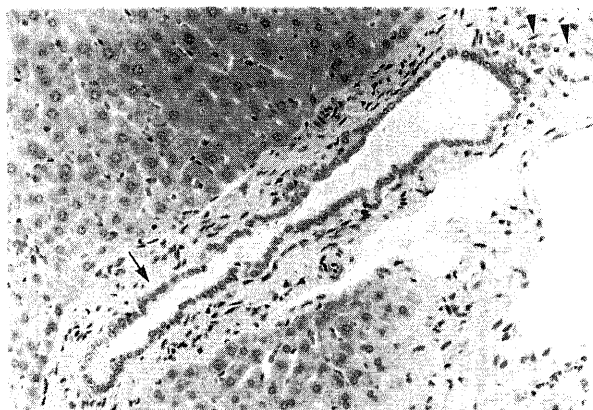


Fig. 3. Light micrograph of the portal tracts of *aly/+* mouse (10 weeks, female). Inflammatory changes are hardly discernible in this large portal tract. There are also no acidophilic substances nor acidophilic crystals in the epithelial cells cytoplasm and also in the lumen of the bile duct (arrows) and peribiliary glands (arrow head). HE,  $\times 100$ .

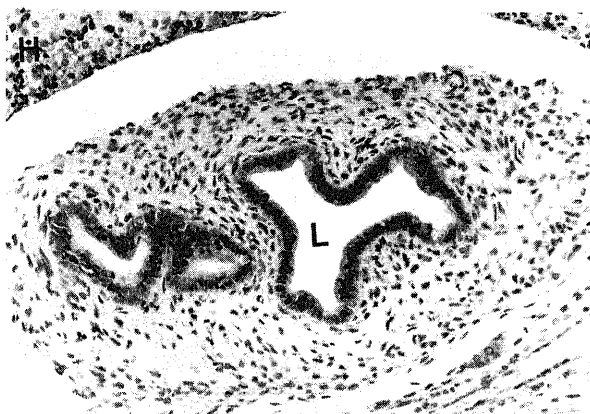


Fig. 4. Light micrograph of the portal tract of *aly/aly* or *aly/+* mice (new born, female). Inflammatory changes are not clear in the portal tract. There are no acidophilic substance nor acidophilic crystals seen in the biliary epithelial cytoplasm or lumen (L) of the bile ducts. Spindle cells around the bile ducts are immature mesenchymal cells. H, hepatic parenchyma. HE,  $\times 200$ .

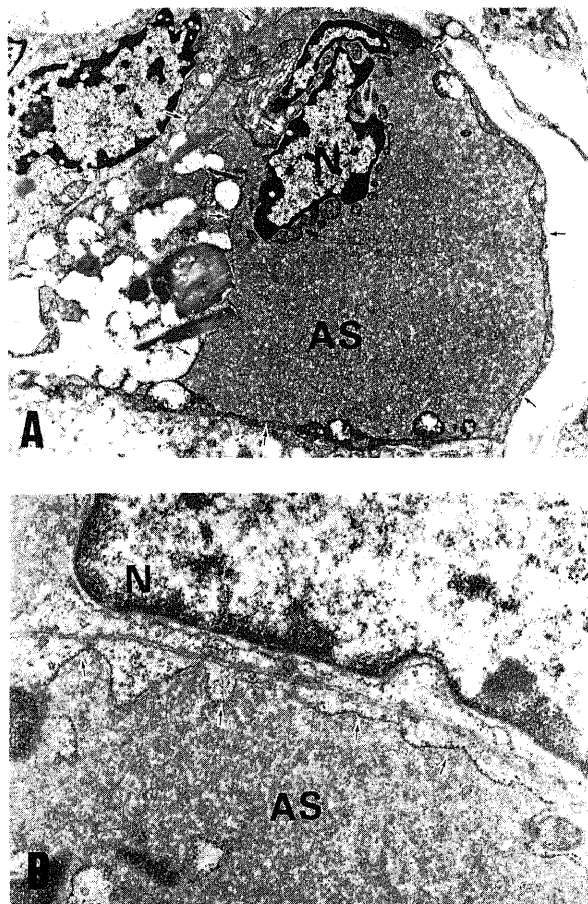
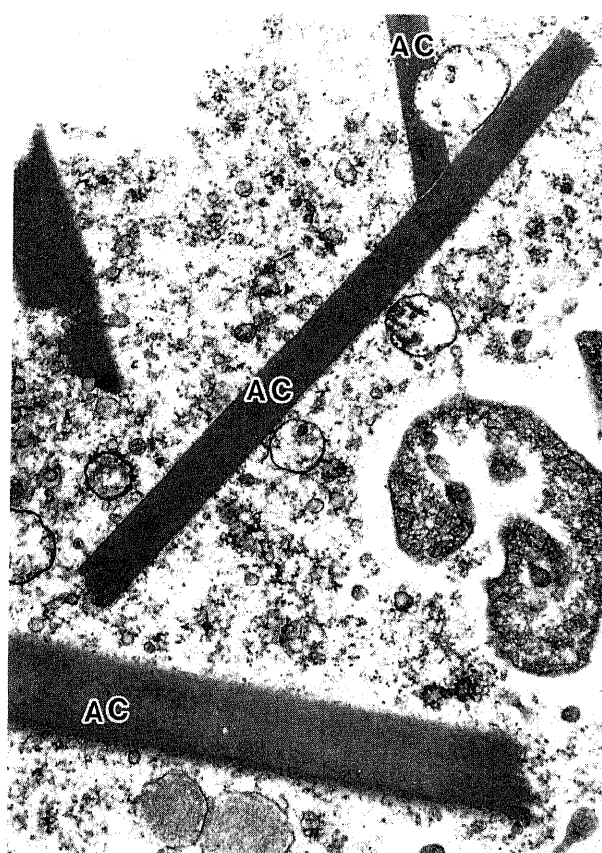


Fig. 5. Electron micrographs of the acidophilic substance (AS) accumulated in the biliary epithelial cells of *aly/aly* mouse (8 weeks, female). (A) Acidophilic substance (AS) is an intracytoplasmic inclusion containing homogeneous electron dense substance and being covered by a membrane (arrows). N, nucleus.  $\times 11000$ . (B) Tiny particles are attached on the membrane which cover the inclusion. These particles appear to be ribosome, suggesting that the acidophilic substance are deposited in the dilated lumen of rough endoplasmic reticulum. N, Nucleus.  $\times 36000$ .



であった。これらの所見より、胆管上皮の好酸性物質は粘液や消化管や脾に存在する内分泌細胞の分泌顆粒とは異なる性質をもつことが示唆された。次に、免疫組織化学的検討ではIgM陰性、IgG陰性であり、胆管上皮の好酸性物質は、免疫グロブリンの貯留ではないことが示された。各種消化管ホルモンに対する抗体を用いた免疫組織化学的検討では、胆管上皮の好酸性物質は抗グルカゴン抗体では陰性であったが、ガストリン、ソマトスタチン、シスタチンC、セロトニンに対する抗体では、明らかに背景よりも強い染色性がみられ、陽性像と判断された(図7)。これらの抗体で、好酸性物質貯留細胞の胞体が選択的に染色された。すなわち、好酸性物質で緊満した上皮細胞の胞体がび漫性に同程度の染色強度で染色された。なお、細胞膜が染色されなかったことから、各々の抗体は細胞表面の物質ではなく、細胞質内の物質と反応したと考えられた。なお、好酸性物質の貯留が見られない胆管上皮細胞はいずれも陰性であり、背景の肝細胞、類洞の内皮細胞、血管内皮細胞、細胞外基質は陰性であった。

次に、陽性所見を呈した抗ガストリン抗体、抗ソマトスタチン抗体、抗シスタチンC抗体、抗セロトニン抗体での染色バ

Fig. 6. Electron micrograph of the acidophilic crystals in the lumen of the bile duct of *aly/aly* mouse (8 weeks, Female). Acidophilic crystals (AC) are rectangle shaped and show homogeneous low electron density. They are not covered by the membrane. Fragments of cellular organelles are also seen in the bile duct lumen.  $\times 42000$ .

Table 2. Histochemical characterization of acidophilic substance (AS) accumulated in the cytoplasm of biliary epithelial cells of *aly/aly* mice

Staining method	BEC	AS	Positive control tissue
PAS	—	—	Intestine ( <i>aly/</i> + mouse)
di-PAS	—	—	Intestine ( <i>aly/</i> + mouse)
Alcian blue (pH2.5)	—	—	Intestine ( <i>aly/</i> + mouse)
Grimerius	—	—	Intestine ( <i>aly/</i> + mouse)
Fontana-Masson	—	—	Intestine ( <i>aly/</i> + mouse)

BEC, biliary epithelial cells without AS in the cytoplasm ; AS, acidophilic substance accumulated in the cytoplasm of biliary epithelial cells ; PAS, periodic acid Schiff ; di-PAS, diastase treated periodic acid Schiff.  
—, negative.

Table 3. Immunohistochemical characterization of acidophilic substance accumulated in the cytoplasm of biliary epithelial cells of *aly/aly* mice

Antibodies against	BEC	AS	Positive control tissue
m-IgM	—	—	Intestine ( <i>aly/</i> + mouse)
m-IgG	—	—	Intestine ( <i>aly/</i> + mouse)
h-gastrin	—	+	Stomach ( <i>aly/</i> + mouse)
h-cystatin C	—	+	Stomach ( <i>aly/</i> + mouse)
h-somatostatin	—	+	Pancreas ( <i>aly/</i> + mouse)
h-glucagon	—	—	Pancreas ( <i>aly/</i> + mouse)
h-serotonin	—	+	Pancreas ( <i>aly/</i> + mouse)

—, negative ; +, diffusely positive.

ターンを共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。いずれも染色強度の程度差はあるものの、好酸性物質に一致して、細胞質にびまん性に陽性像が見られ、核を圧排している像が見られた。共焦点レーザー顕微鏡では3次元方向での物質の分布が解析可能である。そこで、5 $\mu$ mの厚さの切片を焦点を変えながら検討した結果、これら抗体と反応する物質は胞体内に偏り無くほぼ充満していることが示された。陽性染色は均一に胞体内に見られ、染色強度に差は無いことから、これらの抗体が均一に分布する物質に対して反応していることが示された(図8)。また、細胞膜にはどの切断面でも陽性像が見られなかったことから、これら抗体と反応する物質は、細胞質内にのみ存在することが示された。また、各々の抗体での染色パターンに差が見られなかったことから、胆管上皮にみられる好酸性物質は検索した抗体の抗原決定基を均一に含む物質の異常貯留である可能性が示唆された。

一方、細胞質内、胆管腔内に見られた好酸性の結晶構造物は粘液染色、好銀性、銀還元性染色のいずれでも陰性であり、さらに免疫組織化学的検討では、いずれの抗体を用いた染色においても明らかな陽性像は認められなかった。

#### IV. 全身臓器でのシスタチンCの発現

aly/aly マウスの胆管上皮細胞の好酸性物質が最も強く反応した抗シスタチン抗体を用いて、肝以外のシスタチンCの発現を検討した。aly/aly マウスの胃幽門腺、十二指腸ブルンナー腺の一部、気管上皮、腎尿細管上皮、唾液腺の腺房および導管で弱陽性像が得られた。しかし胆管上皮での好酸性物質で得られた強い染色性はいずれの臓器でも認められなかった。

#### V. 好酸性物質貯留胆管上皮細胞の初代培養

aly/aly マウスにみられる好酸性物質を貯留する胆管上皮細胞の性状をさらに検討する目的で、好酸性物質を貯留する胆管上皮細胞の初代培養を行った。培養前に別途採取した胆管組織を細切してHE染色標本を作製し、好酸性物質の貯留が肝門部胆管のほぼ全ての細胞に認められることを確認した。培養開始後、3日目より、ゲル培地上の培養移植片から胆道系上皮細胞がシート状に増殖する像が観察された。位相差顕微鏡による観察では増殖した胆道系上皮細胞は敷石様に配列し、次第にシート状にゲル培地上を増殖進展し、コロニーを形成した。位相差顕微鏡下での胆道系上皮細胞と間質系細胞の区別は容易であり、コロニーの増殖先端部では間質細胞の混入のない領域が所々に認められた。これらの標本をHE染色で観察すると胆道系上皮細胞はゲル培地上を1層性に増殖進展し、コロニーの中

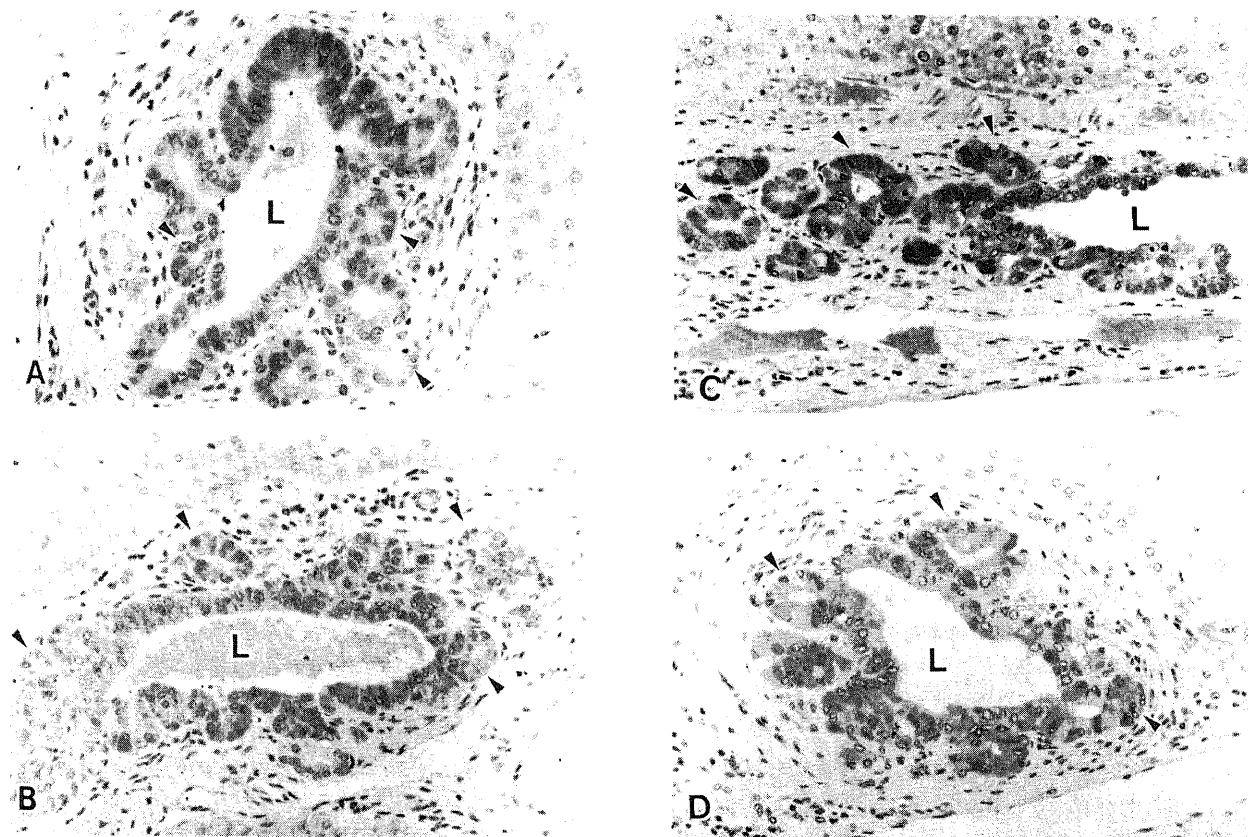


Fig. 7. Immunohistochemistry of the bile ducts and the acidophilic substance accumulated in the cytoplasm of the lining epithelial cells of the bile ducts and of proliferated peribiliary glands. (A, gastrin; B, somatostatin; C, cystatin C; D, serotonin). The accumulated acidophilic substances are positive for gastrin. The staining pattern of these hormonal substances is quite similar to each other (A-D). The other cytoplasmic areas and also pseudopyloric glands are negative for these hormonal substances. L, bile duct lumen; arrowheads, proliferated peribiliary glands. (A), avidin-biotin complex with horseradish peroxidase method (ABC/PO) for gastrin and hematoxylin  $\times 200$ ; (B), ABC/PO for somatostatin  $\times 200$ ; (C), ABC/PO for cystatin C  $\times 200$ ; (D), ABC/PO for serotonin  $\times 200$ .



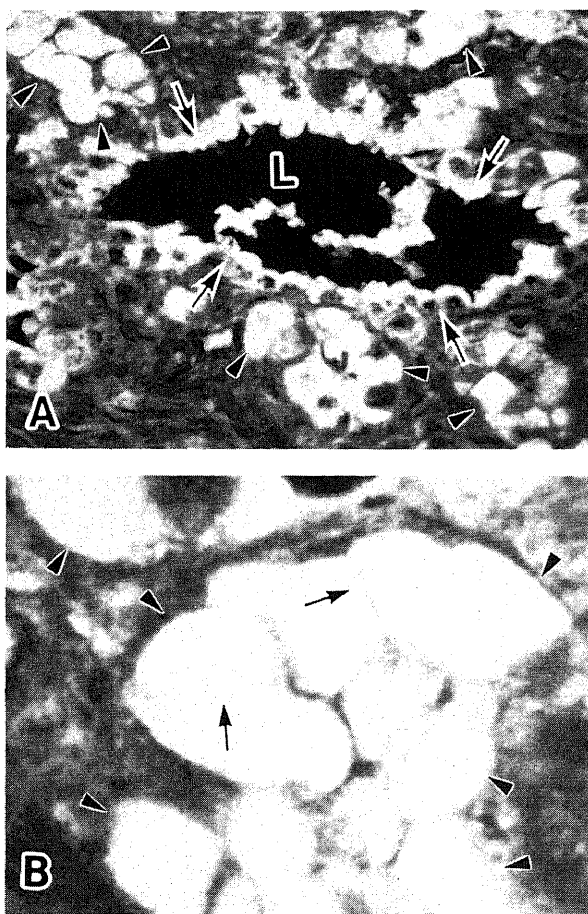


Fig. 8. Confocal laser micrographs of the acidophilic substance accumulated in the biliary epithelial cytoplasm, stained by anti-cystatin C antibody. (A) Homogeneous positive staining is seen within the cytoplasm of the bile duct (arrows) and also proliferative peribiliary glands (arrowheads). L, bile duct lumen. (A): streptavidin-biotin complex with alkaline phosphatase method (streptABC/AP) for cystatin C  $\times 200$ . (B) Higher magnification of (A). Cytoplasm of the peribiliary glands is filled by positive materials (arrowhead). Cell membranes (arrows) are spared from this staining in any sections. (B): streptABC/AP for cystatin C  $\times 600$ .

心部では円柱状～立方状の形態を示し、辺縁部では扁平な細胞形態を示していた。これらの細胞のいずれにも細胞質への好酸性物質の貯留や核の偏在は認められなかった。また、好酸性結晶構造も確認されなかった。

#### 考 察

最近、我が国で新しい免疫不全マウスが開発され、その特異な免疫動態より、免疫機構や免疫性疾患を検索するのに有効な動物モデルとして注目されている<sup>11-13</sup>。このマウスは、常染色体性単純劣性遺伝子支配下の突然変異体で *ALY* 系マウスと呼ばれている。特に、ホモ接合体である *aly/aly* マウスは液性免疫機能と細胞性免疫機能の両者に著しい障害が認められ、リンパ球とリンパ組織微小環境との相互作用の異常に起因する免疫異常が原因と考えられているが、その正確な免疫機序に関しては未だ不明な点が多い。このマウスは肺、肝、腎、脾、唾液腺に

リンパ球浸潤が見られる事が知られており、特に脾、唾液腺の導管周囲に有意なリンパ球浸潤が見られることから、シェーグレン症候群の動物モデルとして注目されている<sup>7</sup>。なお、ヒトにおいて、シェーグレン症候群患者の半数以上で PBC が合併すること、さらに PBC の CNSDC とシェーグレン症候群の導管病変が比較的類似していることから、従来より、シェーグレン症候群と PBC との関連が注目されている<sup>9-12</sup>。特に最近、PBC とシェーグレン症候群の合併例で唾液腺導管上皮と胆管上皮に、PBC の患者血清中に高率に出現する抗ミトコンドリア抗体の主要対応抗原であるピルビン酸脱水素酵素の E2 成分 (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex, PDC-E2) が異常に発現していることが示されている<sup>11,12</sup>。そして、PDC-E2 等の胆管上皮と唾液腺の導管上皮に共通する抗原が、肝と唾液腺で共通した免疫反応を引き起こしている可能性が示唆されている。つまり、シェーグレン症候群のモデルマウスである *aly/aly* マウスの肝臓、特に胆管を中心とした免疫病理学的検索は胆管と唾液腺導管の共通性を考える上でも、また PBC の病態を考える上でも興味深いと考えられる。そこで今回、*aly/aly* マウスの肝、胆管系とそれらをめぐる微小環境の変化を解析するため、病理組織学的、免疫組織化学的に詳細な検索を行い、さらに胆管上皮の初代培養を用いた検討も行った。

*aly/aly* マウスの肝臓では全例で門脈域や血管周囲に様々な程度のリンパ球浸潤が認められた。ほとんどの例で中等度のリンパ球浸潤を認める門脈域がみられ、高度なものではリンパ濾胞の形成もみられた。明らかに胆管の周囲にリンパ球が集簇している *aly/aly* マウスも認められた。これらの門脈域の胆管系では、上皮に全く変化のないものから、増生像やその他の障害像を示すものなど種々であり、慢性胆嚢炎や慢性胆管炎で見られる偽幽門腺化生を示すものも高率に認められた。これらの病理像のいくつかは PBC の胆管に見られる CNSDC<sup>19,20</sup> に類似していた。しかし、PBC で必発する胆管消失像や類上皮細胞肉芽腫、好酸球浸潤等は見られなかった。

今回の検討で *aly/aly* マウスでは、門脈域へのリンパ球浸潤に加えて、胆管上皮の胞体内に好酸性物質が貯留するものが多数見られた。さらに、これらの好酸性上皮を認める胆管の管腔内には、長方形～多角形の好酸性均質な結晶が多数認められた。なお、好酸性物質の胆管上皮への貯留や好酸性の結晶は *aly/aly* マウス全例に見られたのに対し、ヘテロ接合体である *aly/+* マウスでは見られなかったため、これらの上皮の変化はホモ接合体である *aly/aly* マウスに特異的な変化と考えられた。

今回 *aly/aly* マウスの胆管上皮に見られた好酸性物質に関して、従来いくつかの報告がなされている。すなわち、1973年、Rabsteinらは SWR/J マウスの胆管系で類似の物質を見出し、この様な病変が胆管系の非腫瘍性腺腫様病変に関連して出現すると記載している<sup>21</sup>。また、Enomoto らは1974年、無処置群の DDD マウスで好酸性結晶と粘液様物質を増殖性変化を示す胆嚢および肝外胆管に見出している<sup>22</sup>。さらに Nakao らは8例の CD-1 マウスの肝内および肝外の胆道系、膵管および気管に同様な変化を認め、結晶性排出物を伴う腺腫様病変に関連していたと報告している<sup>23</sup>。これらいくつかの報告に見られる物質と、今回 *aly/aly* マウス胆管上皮細胞に見られた好酸性物質が同じものであるかどうかは明らかではないが、いずれの報

告においても、この物質の最終的な同定はなされておらず、その発現機序も未だ不明である。

今回 *aly/aly* マウスにおける本病変の電顕的検索の結果、*aly/aly* マウスの好酸性物質は拡大した粗面小胞体内に貯留する物質であることが示された。胆管自身が産生した内因性のものか、他の細胞によって作られ、胆管上皮に蓄積した外因性のものかが問題となるが、粗面小胞体内への蓄積であることから、胆管上皮自身が産生した物質と考えられる。胞体内、特にリボゾームや粗面小胞体で作られた物質が、輸送障害あるいは排泄障害等のためゴルジ装置での成熟過程に移行できず、粗面小胞体内に貯留している可能性が高いと考えられる。最近、薬物代謝や細胞の腫瘍化に関連して蛋白質の前駆体やストレス蛋白等の物質を貯留する拡張した粗面小胞体が出現するという報告がいくつかなされている<sup>24)~27)</sup>。特に、炎症等の様々な微小環境の変化に対応あるいは適応する物質の過剰産生像、あるいは輸送、排泄障害によるゴルジ装置での修飾障害像、あるいは小胞体内のプロテアーゼの失活、不活化による長いペプチドのトリミング障害<sup>28)</sup>で、小胞体に輸送されてきた長いペプチドがそのまま蓄積している可能性等が指摘されている。

さて、今回報告した胆管上皮での好酸性物質の発現は、ヒトの胆道系では従来報告されていない。しかしヒト胃切除症例において、幽門腺や十二指腸のブルンナー腺に *aly/aly* マウスに見られたものと性質の類似した好酸性物質の貯留が最近報告されている<sup>30)</sup>。つまり、Rubio らは、その貯留物質は、幽門腺、ブルンナー腺から生理的に分泌されているシスタチンCに対する抗体と強く反応したと報告している。さて、胆管上皮や胆嚢粘膜上皮細胞は慢性炎症刺激にしばしば胃粘膜上皮化生や腸上皮化生等を示すことが知られている<sup>31)~33)</sup>。*aly/aly* マウス胆管上皮にも偽幽門腺化生が見られることから、この胆管上皮の好酸性物質が消化管の粘膜化生に関連して発生した可能性が考えられる。さて、ヒト消化管には種々の消化管ホルモンが広範に分布する<sup>39)~41)</sup>。ヒト肝内胆管系にも内分泌細胞の存在が従来より報告されており<sup>42)</sup>、*aly/aly* マウス胆管上皮でみられた好酸性物質も、消化管ホルモンと関係する可能性が考えられる。そこでシスタチンC、さらにいくつかの消化管ホルモンに対する抗体を用いた免疫組織化学的検討、いくつかの特殊染色により、好酸性物質の構成成分の同定を試みた。その結果、胆管上皮での好酸性物質は粘液染色は陰性であり、さらに内分泌細胞が反応するグリメリウス染色やフォンタナーマッソン染色が陰性で、IgM、IgG も含まれないことが明らかとなった。しかし、シスタチンC、さらにいくつかの消化管ホルモン抗体に陽性反応を示した。陽性反応の特異性を確認する目的で抗シスタチンC抗体を対象に、ヒト抽出シスタチンCによる吸収試験を行ったところ、陽性反応は陰性化し、免疫染色の特異性が確認された。

一般的に、消化管ホルモンの多くは前駆体として産生され、ゴルジ装置で、様々な修飾、切断を受けて、機能性ホルモンとして分泌顆粒を形成するものが多いとされている<sup>39)</sup>。*aly/aly* マウスに見られたガストリン、シスタチンC、ソマトスタチン、セロトニン陽性の好酸性物質は拡張した粗面小胞体内に見られることから、機能性ホルモンとなるための修飾を受ける以前の前駆体物質(但し、抗原決定基を有している)である可能性が高い。

*aly/aly* マウスの胆管系に、消化管ホルモンの前駆体と考え

られる物質が貯留する機序についてはいくつかの可能性が考えられる。前述した如く、他系マウスにも類似物質が報告されていることから<sup>21)~23)</sup> *aly/aly* マウスが遺伝的に好酸性物質を産生するとは考えにくい。むしろ *aly/aly* マウスの大型胆管周囲に種々の程度で慢性炎症細胞浸潤がみられることがこれら物質の発現に関係していると考えたほうが妥当であろう。また、今回の検討で、初代培養1週間後に好酸性物質が全て胆管上皮から消失しており、*aly/aly* マウスの胆管上皮細胞はおかれる環境が変化すれば、胞体内に貯留した好酸性物質を放出し、あるいは産生を中止することができると類推される。*aly/aly* マウスでは、周囲の胆管に偽幽門腺化生が見られることから、これら炎症性変化と、胆管上皮での好酸性物質の貯留に関連しているのかもしれない。つまり、持続する炎症に対する胆管上皮の適応の過程で、何らかの化生性変化が生じ、ある消化管ホルモン前駆体が産生されるようになったが、胆管のおかれた異常微小環境下で、可逆的な排出障害や物質輸送障害等が起こり、これらの物質が粗面小胞体内に蓄積している可能性が高い。これら物質の生化学的解析と胆管上皮での発現機序の解明は、胆管上皮の種々のストレスへの反応と適応、さらにそれに付随する各種病的状態を追求する上で重要な手がかりになると考えられ、今後の胆道病理の重要な研究課題である。

なお、これら好酸性物質を貯留する胆管の内腔には好酸性結晶が高頻度に出現していた。結晶構造をとることから、この物質は純粋な物質と考えられるが、検討したいずれの特殊染色、免疫染色にも反応せず、物質の同定はできなかった。しかし、その分布形態が、胆管上皮の好酸性物質貯留と深い関係があると考えられることから、好酸性物質が、胆汁その他の物質と反応して形成した物質である可能性が考えられた。

次にこの好酸性物質が、総胆管、肝門部大型胆管の胆管上皮に選択的に貯留することから、これらの物質を含む胆管系を免疫学的に特異的に標的とする動物モデルの作製につながる可能性がある。つまり、これらの胆管系の免疫病理の解析の手がかりとなることが期待できる。今回、全身臓器へのシスタチンC発現を検討した結果、一見正常な胃、十二指腸の幽門腺、ブルンナー腺、気管支粘膜、腎尿細管、唾液腺等広い範囲の臓器で弱陽性の発現が見られ、最近報告された諸臓器へのシスタチンCの分布にはほぼ一致していた<sup>43)~44)</sup>。しかし、今回の検討で明らかとなった胆管上皮での好酸性物質に見られるような強い陽性像は認められなかった。これらの結果より、適当量の抗シスタチンC抗体投与によって、好酸性物質貯留胆管上皮を選択的に標的とする免疫動物作製が期待される。現在、PBCや原発性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)のモデルとして、種々の胆管障害モデルマウス作製が各施設で試みられている。最近では、免疫不全マウスや新生児期に胸腺を摘出したマウスを用いて、胆管に存在する様々な物質を用いた免疫が多く施設で試みられているが<sup>45)~47)</sup>、いずれも一過性の胆管炎は見られるものの胆管消失は見られず、また、免疫を中止すると胆管炎自体が軽快し、如何にして胆管の持続炎症を導入するかが大きな研究課題となっている。*aly/aly* マウスは無処置状態で胆管炎を有しており、持続炎症の導入は容易であることから、抗シスタチン抗体を用いた選択的胆管破壊との組合せで、胆管のみを特異的かつ強力に障害する新しい胆管消失モデルの作製が期待される。今後、この好酸性物質のさらなる解析をすすめる、PBCやPSCの動物モデルの作製を試みる予定である。

## 結 論

最近我が国で開発された免疫不全マウス *ALY* 系のホモ接合体である *aly/aly* マウスを対象に、新生児、8週令、10週令、12週令における肝、胆道系の変化をヘテロ接合体である *aly/+* マウスと病理学的に比較検討し以下の結論を得た。

1) 8週令以降、*aly/+* マウスの肝、胆管系には著変がみられないのに比べ、*aly/aly* マウスは門脈域内にリンパ濾胞形成を伴う軽～中等度のリンパ球浸潤がみられ、胆管上皮に種々の変性像、偽幽門腺化生、胆管破壊像、それに胆管を中心とする炎症所見が見られた。なお、出生直後には *aly/+* マウスと *aly/aly* マウスの肝、胆道系には明らかな異常所見は見られず、胆管周囲へのリンパ球浸潤等の炎症所見も見られなかった。

2) *aly/aly* マウスでは8週令以降の全個体において、大型胆管上皮の胞体内に均一な好酸性物質を蓄積した、好酸性の上皮細胞の出現を認めた。好酸性細胞で構成される胆管腔内には長方形～多角形の好酸性結晶の出現が見られた。一方 *aly/+* マウスには好酸性物質は胆管上皮にも胆管腔内にも見られなかった。

3) 電顕的検索の結果、*aly/aly* マウス胆管上皮の好酸性物質は拡張した粗面小胞体内に蓄積していることが示された。胆管腔内の好酸性結晶は電顕的にも無構造な結晶であった。

4) 免疫組織化学的検討の結果、胆管上皮内の好酸性物質は消化ホルモンであるシスタチンC、ガストリン、ソマトスタチン、セロトニンに対する抗体と種々の強さで反応し、これら抗体の認識する抗原決定基を含む物質であることが示された。

5) *aly/aly* マウス胆管上皮の好酸性物質は、1週間の初代培養の後には胞体内に全く見られなくなったことより、好酸性物質蓄積は胆管上皮がおかれている炎症等のストレスに深く関わって発現していると推察された。

6) *aly/aly* マウスに蓄積する好酸性物質に対する抗体を用いて、胆管を特異的に破壊する新しいマウスの胆管障害モデル作製の可能性が示唆された。特に PBC や PSC のモデルとしての可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を頂きました本学第二病理中沼安二教授に心より感謝致します。また、本研究に御協力頂きました富山市民病院病理科部長の齋藤勝彦博士、鳥取大学の寺田忠史教授、本学第二病理学教室の細 正博講師、河野尚子博士ら、諸氏に深謝致します。なお、本論文の一部は、第85回日本病理学会総会(東京、1996)で発表した。

## 文 献

- 1) Miyawaki S, Nakamura Y, Suzuka H, Koba M, Yasumizu R, Ikehara S, Shibata Y. A new mutation, *aly*, that induces a generalized lack of lymph nodes accompanied by immunodeficiency in mice. *Eur J Immunol* 24 : 429-434, 1994
- 2) Kuramoto T, Mashimo T, Koike R, Miyawaki S, Yamada J, Miyasaka M, Serikawa T. The *alymphoplasia* (*aly*) mutation co-segregates with the intercellular adhesion molecule-2 (ICAM-2) on mouse chromosome 11. *International Immunol* 6 : 991-994, 1994
- 3) Nannno M, Matsumoto T, Koike R, Miyasaka M, Kawaguchi M, Masuda T, Miyawaki S, Cai Z, Shimamura

T, Fujiura Y. Development of intestinal intraepithelial T lymphocytes is independent of Peyer's patches and lymph nodes in *aly* mutant mice. *J Immunol* 153 : 2014-2020, 1994

4) 宮脇茂樹, 中村 豊. *aly* マウスの発見とその免疫機能. *Medical Immunol* 27 : 453-456, 1994

5) 小宮山一雄, 佐藤淳一, 浅野博文, 草間 薫, 福田正勝, 須田勝行, 木所義博, 神津光昭, 清水康司, 工藤逸郎, 茂呂周. IgA 欠損 *aly/aly* マウス における Polymeric Ig receptor (SC) の局在に関する免疫組織化学的および mRNA 発現の検討. *消化器と免疫* 31 : 67-72, 1995

6) 石川博通, 藤浦康良. *aly* マウスにおける腸管リンパ組織の発達分化. *Medical Immunol* 27 : 475-478, 1994

7) 鐔田利恵子, 鐔田武志, 新蔵礼子, 本庶 佑, 熊谷俊一, 中尾一和, 宮脇茂樹, 日合 弘. シェーグレン症候群モデル動物としての *ALY* マウス. *Medical Immunol* 27 : 467-473, 1994

8) Ito M, Kojima T, Miyata M, Saka M, Kokubun M, Ohira H, Ishikawa H, Kuroda M, Sato Y, Takagi T. Primary biliary cirrhosis (PBC)-CREST (calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dysfunction, sclerodactylia and telangiectasia) overlap syndrome complicated by Sjogren's syndrome and arthritis. *Intern Med* 34 : 451-454, 1995

9) Dorner T, Held C, Trebeljahr G, Lukowsky A, Yamamoto K, Hiepe F. Serologic characteristics in primary biliary cirrhosis associated with sicca syndrome. *Scand J Gastroenterol* 29 : 655-660, 1994

10) Epstein O, Thomas HC, Sherlock S. Primary biliary cirrhosis is dry gland syndrome with feature of chronic graft-versus-host disease. *Lancet* 1 : 1166-1168, 1980

11) Joplin RE, Johnson JG, Matthews JB, Hamburger J, Lindsay JG, Hubscher SG, Strain AJ, Neuberger JM. Distribution of pyruvate dehydrogenase dihydrolipoamide acetyltransferase (PDC-E2) and another mitochondrial marker in salivary gland and biliary epithelium from patients with primary biliary cirrhosis. *Hepato* 19 : 1375-1380, 1994

12) Tsuneyama K, Van de Water J, Nakanuma Y, Cha S, Ansari A, Coppel R, Gershwin ME. Human combinatorial autoantibodies and mouse monoclonal antibodies to PDC-E2 produce abnormal apical staining of salivary glands in patients with coexistent primary biliary cirrhosis and Sjogren's syndrome. *Hepato* 20 : 893-898, 1994

13) Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29 : 577-580, 1981

14) Wood GS, Warnke R. Suppression of endogeneous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection system. *J Histochem Cytochem* 29 : 1196-1204, 1981

15) 河村泰仁. 胆道系上皮細胞のコラーゲン・ゲル内初代培養の試み. *十全医会誌* 98 : 993-1006, 1989

16) 齋藤勝彦, 吉田一晴, 河野尚子, 中沼安二. コラーゲン・ゲル上 microexplant 培養法を用いた胆道系上皮細胞の継代純粋培養法. *日消誌* 89 : 2693-2699, 1992

17) 吉田一晴. 家兎胆嚢上皮の細胞極性発現とその異常: コ

- ラーゲングル内培養法を用いた形態学的検討. 十全医会誌 103: 408-424, 1994
- 18) 片柳和義. マウス胆道系上皮細胞の区分別培養法の確立. 十全医会誌 105: 54-70, 1996
- 19) 中沼安二. 肝門脈域の病理: 胆管系を中心に. 消化器と免疫 30: 1-11, 1995
- 20) Nakanuma Y, Tsuneyama K, Gershwin ME, Sasaki M. Pathology and immunopathology of primary biliary cirrhosis with emphasis on bile duct lesion: Recent progress. *Seminars Liv Dis* 15: 313-328, 1995
- 21) Rabstein LS, Peters RL, Spahn GJ. Spontaneous tumors and pathologic lesions in SWR/J mice. *J Natl Cancer Inst* 50: 751-758, 1973
- 22) Enomoto M, Naoe S, Harada M, Miyata K, Saito M, Noguchi Y. Carcinogenesis in extrahepatic bile duct and gallbladder-carcinogenic effect of N-hydroxy-2-acetaminofluorene in mice fed a "gallstone-inducing" diet. *Jpn J Exp Med* 44: 37-54, 1974
- 23) Nakao Y. A tumor-like lesion with crystalline excrements in bile duct system and certain other organs in mice: A light and electron microscopic study. *J Clin Electron Microscopy* 18: 141-161, 1985
- 24) Saika S, Ooshima A, Hashizume N, Yamanaka O, Tanaka S, Okada Y, Kobata S. Effect of lysyl hydroxylase inhibitor, minoxidil, on ultrastructure and behavior of cultured rabbit subconjunctival fibroblasts. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 233: 347-353, 1995
- 25) Schaumburg-Lever G, Gehring B, Kaiserling E. Ultrastructural localization of factor XIIIa. *J Cutan Pathol* 21: 129-134, 1994
- 26) Kambe K, Yamamoto A, Yoshimori T, Hirayoshi K, Ogawa R, Tashiro Y. Preferential localization of heat shock protein 47 in dilated endoplasmic reticulum of chicken chondrocytes. *J Histochem Cytochem* 42: 833-841, 1994
- 27) Hahn SH, Brantly ML, Oliver C, Adamson M, Kaler SG, Gahl WA. Metallothionein synthesis and degradation in Indian childhood cirrhosis fibroblasts. *Pediatr Res* 35: 197-204, 1994
- 28) Graichen DF, Perez E, Jones DB, Font RL. Kappa-I-mmunoglobulin corneal deposits associated with monoclonal gammopathy. Immunohistochemical and electron microscopic findings. *Ger J Ophthalmol* 3: 54-57, 1994
- 29) Biemans R, Thines D, Petre Parent B, De Wilde M, Rutgers T, Cabezon T. Immunoelectron microscopic detection of the hepatitis B virus major surface protein in dilated perinuclear membranes of yeast cells. *DNA Cell Biol* 11: 621-626, 1992
- 30) Noda T, Farquhar MG. A non-autophagic pathway for diversion of ER secretory proteins to lysosomes. *J Cell Biol* 119: 85-97, 1992
- 31) Valettib C, Grossi CE, Milstein C, Sitia R. Russell bodies: a general response of secretory cells to synthesis of a mutant immunoglobulin which can neither exit from, nor be degraded in, the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 115: 983-994, 1991
- 32) Boissy RE, Beato KE, Nordlund JJ. Dilated rough endoplasmic reticulum and premature death in melanocytes cultured from the vitiligo mouse. *Am J Pathol* 138: 1511-1525, 1991
- 33) Falk K, Rotzschke O, Rammensee HG. Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 348: 248-251, 1990
- 34) Rubio CA, Hirota T, Itabashi M, Jacobsson B, Lignelid H. Eosinophilic bodies in pyloric and Brunner's gland cells. *J Clin Pathol* 45: 1119-1120, 1992
- 35) Kurumaya H, Terada T, Nakanuma Y. "Metaplastic lesions" in intrahepatic bile ducts in hepatolithiasis: A histochemical and immunohistochemical study. *J Gastroenterol Hepatol* 5: 530-536, 1990
- 36) Kurumado K, Nagai T, Kondo Y, Abe H. Long-term observations on morphological changes of choledochal epithelium after choledochenterostomy in rats. *Dig Dis Sci* 39: 809-820, 1994
- 37) Elmore LW, Sirica AE. Phenotypic characterization of metaplastic intestinal glands and ductular hepatocytes in cholangiofibrotic lesions rapidly induced in the caudate liver lobe of rats treated with furan. *Cancer Res* 51: 5752-5759, 1991
- 38) Shimizu M, Kitoh K, Fujimitsu Y, Inada K, Ichinose M, Miki K, Nakazawa S, Shamoto M, Tatematsu M. Cellular differentiation and development of pyloric mucosal metaplasia in the human gall-bladder. *Pathology International* 46: 261-266, 1995
- 39) Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. HARPER'S BIOCHEMISTRY 21st Edition, Appleton & Lange, East Norwalk, 1988. 上代淑人 監訳: ハーパー生化学原書21版 593-616 頁, 丸善株式会社, 東京, 1988
- 40) Townsend CM Jr, Bold RJ, Ishizuka J. Gastrointestinal hormones and cell proliferation. *Surg-Today* 24: 772-777, 1994
- 41) Pearson RK, Anderson B, Dixon JE. Molecular biology of the peptide hormone families. *Endocrinol Metab Clin North Am* 22: 753-774, 1993
- 42) 車谷 宏. ヒト肝内胆管系における内分泌細胞の組織化学的, 免疫組織化学的検索. 十全医会誌 96: 46-57, 1987
- 43) Burnett D, Abrahamson M, Devalia JL, Sapsford RJ, Davies RJ, Buttle DJ. Synthesis and secretion of procathepsin B and cystatin C by human bronchial epithelial cells in vitro: modulation of cathepsin B activity by neutrophil elastase. *Arch Biochem Biophys* 317: 305-310, 1995
- 44) Barka T, van-der Noen H. Expression of the cysteine proteinase inhibitor cystatin C mRNA in rat eye. *Anat Rec* 239: 343-348, 1994
- 45) Henskens YM, Veerman EC, Mantel MS, van-der Velden U, Nieuw-Amerongen AV. Cystatins S and C in human whole saliva and in glandular salivas in periodontal health and disease. *J Dent Res* 73: 1606-1614, 1994
- 46) Barka T, van-der Noen H. Expressions of the genes for cysteine proteinase inhibitors cystatin C and cystatin S in rat

- submandibular salivary gland. Arch Oral Biol 39: 307-314, 1994
- 47) Abrahamson M, Grubb A. Increased body temperature accelerates aggregation of the Leu-68->Gln mutant cystatin C, the amyloid-forming protein in hereditary cystatin C amyloid angiopathy. Proc Natl Acad Sci USA 91: 1416-1420, 1994
- 48) Yasuhara O, Hanai K, Ohkubo I, Sasaki M, McGeer PL, Kimura H. Expression of cystatin C in rat, monkey and human brains. Brain Res 628: 85-92, 1993
- 49) Barka T, van-der Noen H. Expression of the cysteine proteinase inhibitor cystatin C gene in rat heart: use of digoxigenin-labeled probes generated by polymerase chain reaction directly for in situ and northern blot hybridizations. J Histochem Cytochem 41: 1863-1867, 1993
- 50) Lignelid H, Jacobsson B. Cystatin C in the human pancreas and gut: an immunohistochemical study of normal and neoplastic tissues. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 421: 491-495, 1992
- 51) Moin K, Emmert LT, Sloane BF. A membrane-associated cysteine protease inhibitor from murine hepatoma. FEBS Lett 309: 279-282, 1992
- 52) Tanaka K, Iida Y, Tsutsumi Y. Pancreatic polypeptide-immunoreactive gallbladder carcinoid tumor. Acta Pathol Jpn 42: 115-118, 1992
- 53) Lah TT, Kokalj Kunovar M, Kastelic L, Babnik J, Stolf A, Rainer S. Turk-V Cystatins and stefins in ascites fluid from ovarian carcinoma. Cancer Lett 61: 243-253, 1992
- 54) Chapman HA Jr, Reilly JJ Jr, Yee R. Grubb-A Identification of cystatin C, a cysteine proteinase inhibitor, as a major secretory product of human alveolar macrophages in vitro. Am Rev Respir Dis 141: 698-705, 1990
- 55) Krams SM, Dorshkind K, Gershwin ME. Generation of biliary lesions after transfer of human lymphocytes into severe combined immunodeficient (SCID) mice. J Exp Med 170: 1919-1930, 1989
- 56) Kobashi H, Yamamoto K, Yoshioka T, Tomita M, Tsuji T. Nonsuppurative cholangitis is neonatally thymectomized mice: a possible animal for primary biliary cirrhosis. Hepatol 170: 1919-1930, 1989
- 57) Masanaga T, Watanabe Y, Leung PSC, Kamiyasu M, Tsuji K, Aisaka Y, Nakanishi T, Kajiyama G, Gershwin ME. PBC-like lesion is induced and maintained by immunization with recombinant PDC-E2 BCKD-E2 hybrid molecule and lipopolysaccharide injection in neonatally thymectomized mice. Program of DDW1996, P19 (abstract No. 73), 1996

**Pathological and Immunohistochemical Analysis of Acidophilic Substance in the Cytoplasm of Biliary Epithelial Cells and in the Bile Duct Lumen of *aly/aly* Mice** Koichi Tsuneyama, Department of Pathology (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J. J. J. Med Soc., 105, 538-550 (1996)

**Key words** *aly/aly* mouse, biliary epithelial cell, acidophilic substance, cystatin C, chronic cholangitis

#### Abstract

Recently, an autosomal recessive mutant mouse that lacks both systemic lymph nodes and also Peyer's patches has been reported. The name "*alymphoplasia*" with the gene symbol "*aly*", is proposed for this mutant. The mutant homozygotes (*aly/aly*) are defective in both humoral and cell-mediated immune functions, while the heterozygotes (*aly/+*) are normal in such functions. *Aly/aly* mice show nonspecific lymphoid cell infiltration in various tissues, particularly around the conduiting ducts of pancreas and salivary glands. In this study, several hitherto undescribed features of the biliary tree were examined. Portal tracts showed a variable lymphoid cell infiltration with lymph follicles formation in all *aly/aly* mice, and intrahepatic biliary epithelial cells showed variable damage including pseudopyloric gland metaplasia and proliferative changes. Some of these lesions were reminiscent of primary biliary cirrhosis. In addition, extrahepatic bile duct and intrahepatic large bile duct contained acidophilic substance in their epithelial cytoplasm. In the lumen and occasionally in the cytoplasm of these bile ducts, acidophilic crystals were also seen. These acidophilic substance and crystals were found in all *aly/aly* mice aged over 8 weeks, while they were not seen in *aly/+* mice or neonatal *aly/aly* and/or *aly/+* mice. Ultrastructurally, acidophilic substances were membrane-bound intracytoplasmic inclusions with homogeneous electron density, probably being derived from rough endoplasmic reticulum. The acidophilic crystals showed homogeneous electron density. Immunohistochemically, cytoplasmic acidophilic substances were positive for cystatin C, gastrin, serotonin and also somatostatin, simultaneously. The acidophilic crystals did not react with any of these antibodies. These findings suggest that intracytoplasmic acidophilic substances may contain a precursor of these peptide hormone, possibly due to defective secretion or intracellular transport. *Aly/aly* mouse may be a good animal model to analyze the metabolism of the biliary substances, and immune-mediated bile duct damage may be produced in this model by immunological modulations.